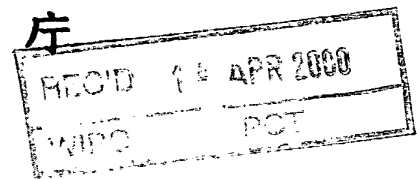


29.02.00

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 3月 1日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第053330号

出願人

Applicant(s):

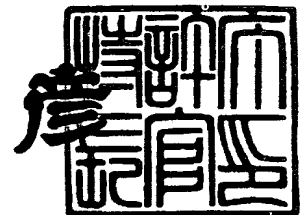
国際試薬株式会社

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 3月31日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3021285

【書類名】 特許願

【整理番号】 DP99-1011

【あて先】 特許庁長官殿

【提出日】 平成11年 3月 1日

【国際特許分類】 G01N 33/92

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 - 2
 国際試薬株式会社 研究開発センター内

 【氏名】 岸 浩司

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 - 2
 国際試薬株式会社 研究開発センター内

 【氏名】 角山 功

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 - 2
 国際試薬株式会社 研究開発センター内

 【氏名】 落合 浩二

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 - 2
 国際試薬株式会社 研究開発センター内

 【氏名】 長谷川 有三

【特許出願人】

 【識別番号】 000170565

 【氏名又は名称】 国際試薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100088904

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 庄司 隆

【選任した代理人】

【識別番号】 100107939

【弁理士】

【氏名又は名称】 大島 由美子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【包括委任状番号】 9815836

【包括委任状番号】 9901104

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生体試料成分の測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 血清中の特定リポ蛋白画分中の成分を酵素反応で測定する方法において、特異的に該成分を測定するために、複合体及び／又は凝集体を形成させることなく、特定リポ蛋白画分の測定目的の成分に対して優先的に酵素反応を可能にする調整手段を導入することを特徴とする特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。

【請求項 2】 前記調整手段が、特定リポ蛋白画分の測定目的の成分が反応液中に溶解しやすくなるように反応液のイオン強度を調整する手段を導入することである請求項 1 記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。

【請求項 3】 前記イオン強度の調整が、高比重リポ蛋白（HDL）中の成分を溶液中に溶解しやすくするために、反応液のイオン強度を十分な程度に高くすることである請求項 2 記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。

【請求項 4】 前記調整手段が、酵素の特定リポ蛋白に対する反応特異性を利用して、特定リポ蛋白画分の成分に対して直接・優先的に反応液中で酵素反応を可能とする手段を導入することを特徴とする請求項 1 記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。

【請求項 5】 前記特定リポ蛋白画分の成分に対して直接・優先的に酵素反応を可能とする手段が、HDL 画分に優先的に作用するリポプロテインリパーゼ又は／及びコレステロールエステラーゼを選択し反応させる請求項 4 記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。

【請求項 6】 前記調整手段が、選択された非イオン性の界面活性剤の特定リポ蛋白に対する反応選択性を利用して、特定リポ蛋白画分の成分に対して直接・優先的に反応液中で酵素反応を可能とする手段を導入することを特徴とする請求項 1 に記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。

【請求項 7】 前記非イオン性の界面活性剤として HLB 値が 16 以上である HDL 画分に対して反応選択性をもつ非イオン性の界面活性剤を使い、HDL 画分の成分に対して直接・優先的に反応液中で酵素反応を可能とする請求項 6 記

載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。

【請求項 8】 前記請求項 5 に記載の手段と、請求項 3 及び 7 に記載の手段のいずれかの手段とが組合された請求項 1 に記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。

【請求項 9】 前記請求項 4 に記載の手段と、請求項 2 及び 6 に記載の手段のいずれかの手段とが組合された請求項 1 に記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。

【請求項 10】 第一酵素反応系において、前記請求項 8 に記載の手段を利用して HDL 画分中のコレステロール成分を選択的に酵素反応させて測定又は消化し、第二酵素反応系において、前記請求項 4 に記載の手段及び HLB 値が 11～13 である非イオン界面活性剤を利用して LDL 画分中のコレステロール成分を酵素反応させる手段を導入することからなる LDL 画分中のコレステロールの測定方法である請求項 1 に記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。

【請求項 11】 前記請求項 10 の第一酵素反応系および第二酵素反応系を、同時に又は別々に処理することによって超低比重リポ蛋白 (VLDL) 中のコレステロール成分を残留させ、ついで VLDL 画分を分解する手段を導入して VLDL 画分中のコレステロール成分を酵素反応させることからなる VLDL 画分中のコレステロールの測定方法である請求項 1 に記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。

【請求項 12】 コレステロール酸化酵素又は／及びコレステロール脱水素酵素を添加して、遊離のコレステロールを消化する工程を付加する前記請求項 8～11 のいずれかに記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。

【請求項 13】 反応液の pH が、リポ蛋白が凝集又は白濁をおこさない範囲であって、リポ蛋白中の成分を酵素反応させる酵素の反応至適範囲により選択される前記請求項 1～12 のいずれかに記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、血清中の特定のリポ蛋白画分中の成分を酵素反応によって測定する手段及び方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

古くからリポ蛋白は、超遠心操作により高比重リポ蛋白（HDL）、低比重リポ蛋白（LDL）、超低比重リポ蛋白（VLDL）、カイロミクロン（CM）に分画していた。この操作は熟練が必要であり、超遠心機を別途備え付け、遠心を数日に渡って行う。そのため、多検体を処理することは出来なかった。これに代わりポリエチレングリコール、またはデキストラン硫酸等のポリアニオンに、マグネシウムやカルシウム等の2価カチオンを共存させたり、リンタングステン酸に2価カチオンを共存させた溶液と血清とを混和させてLDL、VLDL、CMを沈澱させ、遠心後の上清に残るHDLのみを分画する方法が主流となっていた。

【0003】

この方法は、臨床検査の分野で広く普及している自動分析装置を用いることが出来た。即ち、分画したHDL中のコレステロールは、酵素法による総コレステロールの測定が自動分析機で確立しているのでそれを応用し、HDL中のコレステロール濃度を求めることが出来た。しかしながらこの方法も低速ではあるが遠心操作が必要であり、分画剤と血清を混和させるときの人為的な定量誤差や検体の取り違いなどが問題となっていた。その上、自動分析装置で他の一般均な生化学項目と同時に測定出来なかった。臨床検査は迅速な対応が求められておりこのことから検査時間の短縮が課題となっていた。

【0004】

一方、臨床的には動脈硬化のリスクファクターであるLDL中のコレステロール値を重視する報告〔総コレステロールの基準値と設定根拠：動脈硬化，24（6），280（1996）〕もある。現在LDL中のコレステロール値は総コレステロール（T-CHO）、中性脂肪（TG）及びHDL中のコレステロールの測定結果から経験的なファクターを挿入して求める。その式〔Friedewald W. T., et al., Clin. Chem., 18, 499～502（1972）〕を以下に示す。

LDL中コレステロール値＝

$T-CHO \text{ 値} - HDL \text{ コレステロール値} - TG \text{ 値} / 5$

【0005】

この方法は、測定する3項目が全て正確に測定されなければ成立しない。また、TG値が400mg/dlを越えたり、LDL中のコレステロール濃度が100mg/dl以下になると計算値がLDL中のコレステロール濃度を反映しなくなると言われている [Warnick G. R., et al., Clin. Chem., 36(1), 15~19 (1990)], [McNamar a J. R., et al., Clin. Chem., 36(1), 36~42 (1990)]。従って肝心の異常値が求められない方法であった。他に、電気泳動でリポ蛋白を分離し蛋白量を測定する方法やHPLCによるリポ蛋白別コレステロールの測定法もあるが検体処理能力に欠ける方法であり、高価な装置も必要となる。

【0006】

近年、HDL中のコレステロール測定に関して前述した問題を解決するため、全自動のHDL中のコレステロールを測定するキットが開発され普及しつつある。特許番号2600065号号公報、特開平8-201393号公報及び特開平8-131195号公報にみられる技術は、分画剤を併用しており、分画剤に含まれる二価カチオンとして用いられる金属が、自動分析装置で一般的に使用される洗剤で不溶性の沈殿物を形成し、それが廃液機構内で蓄積することによる故障の原因となっている。

【0007】

更に、反応中に不溶性の凝集物を形成し、測定結果に影響を与える濁りが生じて測定誤差の原因となっているばかりか、凝集物により反応セルが汚染されて、同時に測定している他の生化学項目の測定結果に少なからず影響を与えている。

【0008】

更に、既知の方法である2ポイントエンド法、レート法、ダブルレート法、フィックスタイム法などが選択できるようになっているので、濁ったままの状態でも測定は可能である。しかし、それには条件がある。この濁りの中における測定

は、反応中に濁度変化があつては測定値の正確性に問題が生ずる。その他、反応液が濁ると再現性が低下する。それ故、測定する検体に制限が加わり、幅広い測定波長と多種多様な患者検体に対応することが出来ない。

【0009】

例えば、340 nm 付近（短波長域）では凝集物による濁りの現象で吸光度が2～3以上となり分析機の許容範囲をしばしば越えてしまう欠点がある。2価カチオンを用いることのない特開平9-96637号公報記載の技術は、リボ蛋白と凝集する抗血清とを含ませる方法であるが、これも難溶性の抗原抗体凝集物を形成するので、反応セルが汚染される。従つて、同時に測定している他の生化学項目の測定結果に少なからず影響を与える。また、反応液中の濁りが強度となるので、特に短波長域によるHDL中のコレステロール測定に対しても前述と同じ原因で正確な測定が不可能である。

【0010】

これらの技術は、複合体や凝集体を形成することで、酵素反応を阻害する共通の技術と測光法を工夫することで成り立っているものであり、濁り本来が持つ測定への悪影響は、解消されない。このような濁りを最終的に消去する技術も、濁り対策の一つである。特開平6-242110号公報に見られるように、濁りを最終的に消し去る操作を加えれば、正確な測定値が得られるようになる。

【0011】

しかし、この方法では最低でも3～4段階の試薬分注操作が必要となる。市販されている自動分析装置の中には、3～4段階の試薬分注操作が可能なものがあるので応用は可能であるが、やはり一般的に普及している生化学項目用の自動分析機は最大2段階のものが多いので、応用出来ないことがあった。

【0012】

一方、LDL中のコレステロールの測定に至っては、現在も計算による方法を取らざるを得ない状況である。近年、特開平07-280812号公報、WO96/29599号公報、特開平09-313200号公報記載の技術に見られる、完全自動化を目指したLDL中のコレステロール測定法の報告がある。これらは、HDL中のコレステロールと同様に、凝集体や複合体を形成する技術の延長

線上にあるので、やはり、濁りをどう調整するかが今後の課題となる。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】

本発明が、解決しようとする課題は、血清中の特定のリポ蛋白画分中の成分を酵素反応によって測定する方法において、汎用の自動分析装置を用いて、処理工程中に遠心分離操作をすることなく、また、反応液中に複合体や凝集体による濁りを形成することなく、生体試料中のHDL（高比重リポ蛋白）、LDL（低比重リポ蛋白）、VLDL（超低比重リポ蛋白）等のリポ蛋白中の成分を定量する方法を提供することである。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明は、血清中の特定リポ蛋白画分中の成分を酵素反応で測定する方法において、特異的に該成分を測定するために、リポ蛋白画分の成分に作用する酵素の反応性を調整する手段を導入することを特徴とする、特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法を提供する。その手段としては、酵素反応液のイオン強度を調整する物質を添加することによる特定リポ蛋白成分に対する酵素の反応性を調整すること、非イオン界面活性剤を選択することによる特定リポ蛋白成分に対する酵素の反応性を調整すること、及び酵素を選択することによる特定リポ蛋白成分に対する酵素の反応性を調整することが挙げられる。

【0015】

本発明は、上記3つの手段を適宜選択し組合せ、HDL中成分の測定法、LDL中成分の測定法、VLDL中成分の測定法を提供する。

【0016】

【発明の実施の形態】

酵素反応液のイオン強度を調整する物質を添加することによる特定リポ蛋白成分に対する酵素の反応性を調整することは、HDL、LDL、VLDLの各リポ蛋白画分が、水溶解性において差異をもつことからこの性質を利用して、特定画分のみを溶解させ、選択的に特定画分中の成分に対して酵素反応を起こすことを意味する。この目的を達成する一手段として、試料中のイオン強度を上昇させる

。そのイオン強度は、例えばヒドラジン濃度において約 30、より好ましくは 60 mM以上の添加によって達成される。ヒドラジンとしては、ヒドラジン類、塩、水和物、溶媒和物が、HDLの選択溶解性を指標にして使用できる。同様に、NaCl、尿素、グアニジン類、セミカルバジド類を組合せ又は単独で使用してもよい。さらに、これらをヒドラジンと併用して使用してもよい。これらの使用濃度は、HDLの選択溶解性を指標にして要事、実験的繰返しによって、決定できる。

【0017】

酵素の特定リポ蛋白に対する反応特異性を利用して、特定リポ蛋白画分の成分に対して直接・優先的に反応液中で酵素反応を可能とする手段は、HDL画分に優先的に作用するリポ蛋白リパーゼ (LPL) 又は/及びコレステロールエステラーゼ (CE) を選択して行う。この酵素としては、市販の *Chromobacterium viscosum* 由来の LPL、CE が例示される。なお、LDL画分を対象にする場合には、*Pseudomonas* 属由来の酵素などを適宜選択することができる。酵素について、各種修飾化は、酵素活性と特定リポ蛋白画分への選択性が維持されていれば特に限定されない。酵素の添加量は、自体公知の基質量に応じて増減調整される。

【0018】

選択された非イオン性の界面活性剤の特定リポ蛋白に対する反応選択性を利用して、特定リポ蛋白画分の成分に対して直接・優先的に反応液中で酵素反応を可能とする手段とは、非イオン性の界面活性剤の HLB 値によって特定される。

【0019】

HDL画分を対象にする場合、HLB 値が 16 以上のものが選択され、好適には 17 以上が選択される。より好ましくは、HLB 値が 17 以上のポリオキシエチレンエーテル類が選択される。この選択された界面活性剤は、LDL画分に対する LPL、CE、コレステロール脱水素酵素 (CDH) 等の酵素作用を阻害する。具体例を以下に列記するが、HLB 値を指標にして随時選択可能であり、これらに限定されない。セチルエーテル (C16) (ヘキサデシルエーテル) (商品名：日光ケミカル (株) : BC-25TX、BC-30TX、BC-40TX

)、ラウリルエーテル (C12) (ドデシルエーテル) (商品名：日光ケミカル (株) : BL-21、BL-25)、オレイルエーテル (商品名：日光ケミカル (株) : BO-50)、ベヘニルエーテル (C22) (商品名：日光ケミカル (株) : BB-30)、ポリオキシエチレンラウリルエーテル (商品名：日本油脂 (株) : ノニオン K-230)、ポリオキシエチレンモノラウレート (商品名：日本油脂 (株) : ノニオン S-40)、ポリオキシエチレンエーテル類 (商品名：シグマ : Brij 98、Brij 721、Brij 78、Brij 99) 等が挙げられる。

【0020】

LDL画分又はVLDL画分を対象にする場合、とくに積極的にLDL画分の成分への酵素反応を対象とする場合には、HLB値が11～13の非イオン性の界面活性剤が選択される。例示をすれば、トライトンX-100、ノニオンHS210、ノニオンA-10Rがあげられる。しかし、これらもHLB値を指標に随時選択追加可能である。

【0021】

これら界面活性剤の添加量は、目的とするリポ蛋白量により変異するが、HDL及びLDLを対象とした事例において示したのは、検体約5 μ lに対して、界面活性剤濃度0.1～1%の試薬約180 μ lである。これにより、HDL及びLDLが選択的に分解され酵素反応が可能となる。VLDLを対象とする場合には、界面活性剤濃度を1%以上に調整して使用される。これにより、VLDLが選択的に分解され酵素反応が可能となる。

【0022】

酵素反応がなされる反応液のpHは、リポ蛋白が凝集又は白濁をおこさない範囲であって、リポ蛋白中の成分を酵素反応させる酵素の反応至適範囲により選択される。好適には、pH約6～約9である。pHが約6以下であると、リポ蛋白が白濁をおこす。リポ蛋白が比較的安定なpH7付近を選択して測定条件を調整すればよいが、COD (コレステロール酸化酵素)、CDH (コレステロール脱水素酵素)、LPL、及びCE等の酵素の至適pHも考慮する。好適には、CDH、LPL、及びCEの反応は、pH約7～約9が望ましく、CODの反応は、

pH 約 6 ～ 約 8 が望ましい。反応液は、緩衝液で調整することが好ましく、通常生化学反応に用いられる各種緩衝液が利用できる。例示すれば、Hepes 緩衝液、Pipes 緩衝液、Taps 緩衝液、BES-BisTris 緩衝液、Tris-塩酸緩衝液、3-モルホリノプロパンスルホン酸緩衝液、リン酸緩衝液、グッド緩衝液等を自体既知の添加物との適合性により適宜選択し利用する。なお、本発明の実施例及び実験系では、pH 条件に合わせて、各々 Pipes 緩衝液及び Taps 緩衝液を利用した。

【0023】

また所望により、LDL、VLDL 及びカイロミクロン中の遊離型コレステロールが HDL 中のコレステロール測定時の反応に関与して、しばしば誤差の原因となるので、予め、COD 及び／又は CDH でこれらの遊離型コレステロールを反応させてヒドラゾン存在下で、コレステノンヒドラゾンに変換し、HDL 中のコレステロール測定時のために、非基質化しておく方法もある。非基質化する技術は公知であり、例えば特開平 5-176797 号公報を参考にすればよい。

【0024】

本発明においては、上記 3 つの手段（イオン強度の選択、酵素の選択、界面活性剤の選択）を適宜選択し組合せて導入される。より好適には、これら全ての手段を同時に導入するが、必ずしもこれに限定されない。

【0025】

HDL 中のコレステロール成分を測定する場合は、第一の要件として、高比重リポ蛋白（HDL）中の成分を溶液中に溶解しやすくするために、イオン強度を十分な程度に高く調整し、第二の要件として HDL 画分に優先的に作用するリポプロテインリパーゼ（LPL）又は／及びコレステロールエステラーゼ（CE）を選択し、第三の要件として HLB 値が 16 以上である HDL 画分に対して反応選択性をもつ非イオン性の界面活性剤を使い、HDL 画分の成分に対して直接・優先的に反応液中で酵素反応をおこすことが必要である。

【0026】

酵素反応は、CDH をもちいる際の補酵素には、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型（NAD）、チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

酸化型 (t-NAD)、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリル酸酸化型 (NADP)、チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリル酸酸化型 (t-NADP) 等が挙げられる。また、コレステロール酸化酵素も使用できるが、この場合は、パーオキシダーゼと公知の過酸化水素定量法を組み合わせることができる。総コレステロールの測定に必要となる、酵素の活性化剤であるコール酸類や界面活性剤は、その条件を適宜選択し、実験的に濃度を調整すればよい。

【0027】

LDL中のコレステロール成分を測定する場合は、第一酵素反応系において、上記のHDL画分中のコレステロール成分を選択的に酵素反応させ、第二酵素反応系において、LDL画分に対して作用するLPL又は/及びCE、及びLDLを積極的に分解する界面活性剤を加え、CDHによる反応生産物を検出する。検出方法は、既知のレート法、2ポイントエンド法等が所望により利用できる。

【0028】

酵素反応生産物の測定は、CE、LPL等の酵素作用によって生成される化合物であるコレステロールを定量する自体公知の方法によって適宜に以下の測定系が選択される。例えば、CDH-NAD系を用いる場合は340nmの吸光度で測定され、CDH-thioNAD系を用いる場合は405nmの吸光度で測定され、COD系を用いる場合、500nm以上（色原体の種類に依存する）の吸光度で測定される。

【0029】

【実施例】

実施例 1

以下の試薬を調製した。検体は、一般人の血清10例を用いた。測定は、日立7170型自動分析装置で実施した。操作法は、先ず各検体5 μ lに、試薬1-A~C180 μ lをそれぞれ加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nm及び副波長570nmで吸光度1を測定した。更に、試薬2を60 μ l加えて37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nm及び副波長570nmで吸光度2を測定した。吸光度1と吸光度2の差を求めて既知HDL-コレステロール濃度のコントロールを標準液として検体の値を換算した。対照法としてポ

リエチレングリコール（PG）法を用いた。PG法は国際試薬（株）製PGボールを使用した。また、遠心後の上清のコレステロール濃度は、国際試薬（株）製T-CHO試薬・Aを用いて求めた。測定結果として対照法との比較を表1に示した。試薬1-A、1-B、1-Cは対照法によく一致した良好な結果となった。

【0030】

試薬1-A

緩衝液	pH 7.0
二塩化ヒドラジニウム	100 mmol/l
β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型	6.0 mmol/l
コール酸ナトリウム	0.1%
ノニオンK-230（HLB値20）	0.6%

【0031】

試薬1-B

緩衝液	pH 7.0
二塩化ヒドラジニウム	100 mmol/l
β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型	6.0 mmol/l
Brij 97（HLB値19）	0.24%
コール酸ナトリウム	0.1%

【0032】

試薬1-C

緩衝液	pH 7.0
二塩化ヒドラジニウム	100 mmol/l
β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型	6.0 mmol/l
ノニオンK-230（HLB値20）	0.2%
コレステロール酸化酵素（COD）	1.0 U/ml
コール酸ナトリウム	0.1%

【0033】

試薬2

緩衝液

pH 8.5

コレステロール脱水素酵素 (CDH)

20.0 U/ml

LPL

6.0 U/ml

(Chromobacterium viscosum由来)

コール酸ナトリウム

0.2%

【0034】

【表1】

単位: mg/dl

検体	対照法	試薬1-A	試薬1-B	試薬1-C
1	31.6	33.1	22.6	34.0
2	71.6	71.3	70.8	70.3
3	53.8	58.8	56.3	58.2
4	42.4	46.3	39.8	45.2
5	52.6	54.8	49.2	56.2
6	35.9	43.3	39.5	42.4
7	41.1	44.0	41.2	44.9
8	26.0	28.2	27.6	27.3
9	60.0	67.9	66.9	61.0
10	112.0	119.6	121.1	119.7
相関関係		0.995	0.989	0.995
回帰式の傾き		1.039	1.123	1.031
回帰式の切片		1.968	-5.695	1.569

【0035】

実施例2

以下の試薬を調製した。検体は、一般人の血清10例を用いた。測定は、日立7170型自動分析装置で実施した。操作法は、先ず検体3 μ lに試薬A-1を210 μ l加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nm及び副波長570nmで吸光度1を測定した。更に、試薬A-2を70 μ l加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nm及び副波長570nmで吸光度2を測定した。吸光度1と吸光度2の差を求めて既知LDL-コレステロール濃度のコントロールを標準液として検体の値を換算した。試薬B-1と試薬B-2も前述と同様に操作する。対照法は、フリーデワルド式より求めた。HDLコレステロール値は、国際試薬(株)製PGポールを使用した。総コレステロール値は、国

際試(株)製T-CHO試薬・Aを用いて求めた。TG価は、国際試薬(株)製TG試薬・Aを用いて求めた。測定結果を表2に示した。本法は、対照法と比べて良好な結果を得た。

【0036】

試薬A-1

緩衝液	pH 7.8
二塩化ヒドラジニウム	100 mmol/l
コレステロール脱水素酵素(CDH)	20.0 U/ml
β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型	6.0 mmol/l
LPL	6.0 U/ml
(Chromobacterium viscosum由来)	
ノニオンK-230(HLB値20)	0.15%
コール酸ナトリウム	0.1%

【0037】

試薬A-2

緩衝液	pH 8.5
CE(Pseudomonas由来)	3.0 U/ml
ノニオンA-10R	0.5%
デオキシコール酸ナトリウム	8.0 mmol/l

【0038】

試薬B-1

緩衝液	pH 7.8
二塩化ヒドラジニウム	100 mmol/l
β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型	5.0 mmol/l
コレステロール酸化酵素(COD)	0.3 U/ml
LPL	6.0 U/ml
(Chromobacterium viscosum由来)	
ノニオンK-230(HLB値20)	0.15%
コール酸ナトリウム	0.1%

【0039】

試薬B-2

緩衝液

pH 8.5

コレステロール脱水素酵素 (CDH)

20.0 U/ml

CE

3.0 U/ml

(Pseudomonas 由来)

ノニオンA-10R

0.5%

デキオキコール酸ナトリウム

8.0 mmol/l

【0040】

【表2】

単位: mg/dl

検体	対照法	試薬A	試薬B
1	151	155	147
2	173	188	168
3	236	234	220
4	79	79	66
5	173	167	157
6	170	173	163
7	118	123	111
8	87	93	81
9	92	95	90
10	64	72	64
相関関係		0.995	0.996
回帰式の傾き		0.973	0.943
回帰式の切片		7.235	0.083

【0041】

実験例

以下の試薬を調製し、各ファクターの効果を実験1～4で検討した。検体は、一般人の血清10例をプールしたのち、超遠心操作をしてえられる、HDL、LDL、及びVLDL画分を使用した。測定は、日立7170型自動分析装置で実施した。操作法は、先ず各検体5μlに各々180μlの試薬1-D～Gを加え、37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nm及び副波長570nmで吸光度1を測定した。更に、試薬1-D～Gに各々相応する試薬2-D～Gを各

60 μ l 加え、37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nm及び副波長570nmで吸光度2を測定した。吸光度1と吸光度2の差を検定した。

【0042】

実験1のための試薬1-Dと試薬2-D

試薬1-D

緩衝液	pH 7.0
β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型	6.0 mmol/l
コール酸ナトリウム	0.1%

【0043】

試薬2-D

緩衝液	pH 8.5
コレステロール脱水素酵素 (CDH)	20.0 U/ml
LPL	0~15 U/ml

(*Chromobacterium viscosum* 由来)

コール酸ナトリウム	0.2%
-----------	------

【0044】

実験2のための試薬1-Eと試薬2-E

試薬1-E

緩衝液	pH 7.0
二塩化ヒドラジニウム	0~100 mmol/l
β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型	6.0 mmol/l
コール酸ナトリウム	0.1%

【0045】

試薬2-E

緩衝液	pH 8.5
コレステロール脱水素酵素 (CDH)	20.0 U/ml
LPL	6.0 U/ml

(*Chromobacterium viscosum* 由来)

コール酸ナトリウム	0.2%
-----------	------

【0046】

実験3のための試薬1-Fと試薬2-F

試薬1-F

緩衝液

pH 7.0

β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型

6.0 mmol/l

ノニオンK-230 (HLB値20)

0~1.0%

コール酸ナトリウム

0.1%

【0047】

試薬2-F

緩衝液

pH 8.5

コレステロール脱水素酵素 (CDH)

20.0 U/ml

LPL

6.0 U/ml

(*Chromobacterium viscosum* 由来)

コール酸ナトリウム

0.2%

【0048】

実験4のための試薬1-Gと試薬2-G

試薬1-G

緩衝液

pH 7.0

二塩化ヒドラジニウム

100 mmol/l

β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型

6.0 mmol/l

ノニオンK-230 (HLB値20)

0~1.0%

コール酸ナトリウム

0.1%

【0049】

試薬2-G

緩衝液

pH 8.5

コレステロール脱水素酵素 (CDH)

20.0 U/ml

LPL

6.0 U/ml

(*Chromobacterium viscosum* 由来)

コール酸ナトリウム

0.2%

【0050】

実験1についての考察

*Chromobacterium viscosum*由来のLPLのリポ蛋白画分に対する特異性を調べた結果、HDL及びVLDL画分に対して非常に強く作用し、LDL画分に対して弱い反応性を示した。この酵素を使って、以下の実験を進めた。なお、各試薬中に、6U/ml添加することにした。

【0051】

実験2についての考察

ヒドラジンの添加効果を確認した。ヒドラジンの添加は、LPLのHDL画分に対する特異的反応性を更に強めた。LDL画分に対する反応性は、殆ど変動が見られなかった。この結果をもとに試薬1-Dに、100mmol/lのヒドラジンを添加した。

【0052】

実験3についての考察

HLB価20の非イオン系界面活性剤のノニオンK-230/日本油脂(株)を使って、HDL画分に対する添加効果を確認した。非イオン系界面活性剤の添加は、LPLのVLDLに対する反応性を極端に下げ、HDL画分に対する特異的反応性を更に強めた。LDL画分に対するLPLの反応性も、低下させる効果を確認した。この結果をもとに試薬1-Dに、0.6%のノニオンK-230を添加した。

【0053】

実験4についての考察

各ファクターを組合せた結果、より完璧なHDL画分との選択的反応系が確立した。

【0054】

【発明の効果】

以上説明したように本発明の手段を適宜選択し、組合せて導入すると、反応液中のHDL以外の複合体や凝集体による濁りを形成せず、目的とするリポ蛋白中のコレステロールの測定の精度の上昇、簡易化を達成できる。また、本発明は、

本発明の手段を適宜選択し、組合せて導入すると、基質をコレステロール成分に限定されず、他の脂質成分（中性脂肪、リン脂質等）の測定にも応用可能である。

【 0 0 5 5 】

【図面の簡単な説明】

【図 1】 L P L の添加効果を示した図である。（実験 1）

【図 2】 ヒドラジンの添加効果を示した図である。（実験 2）

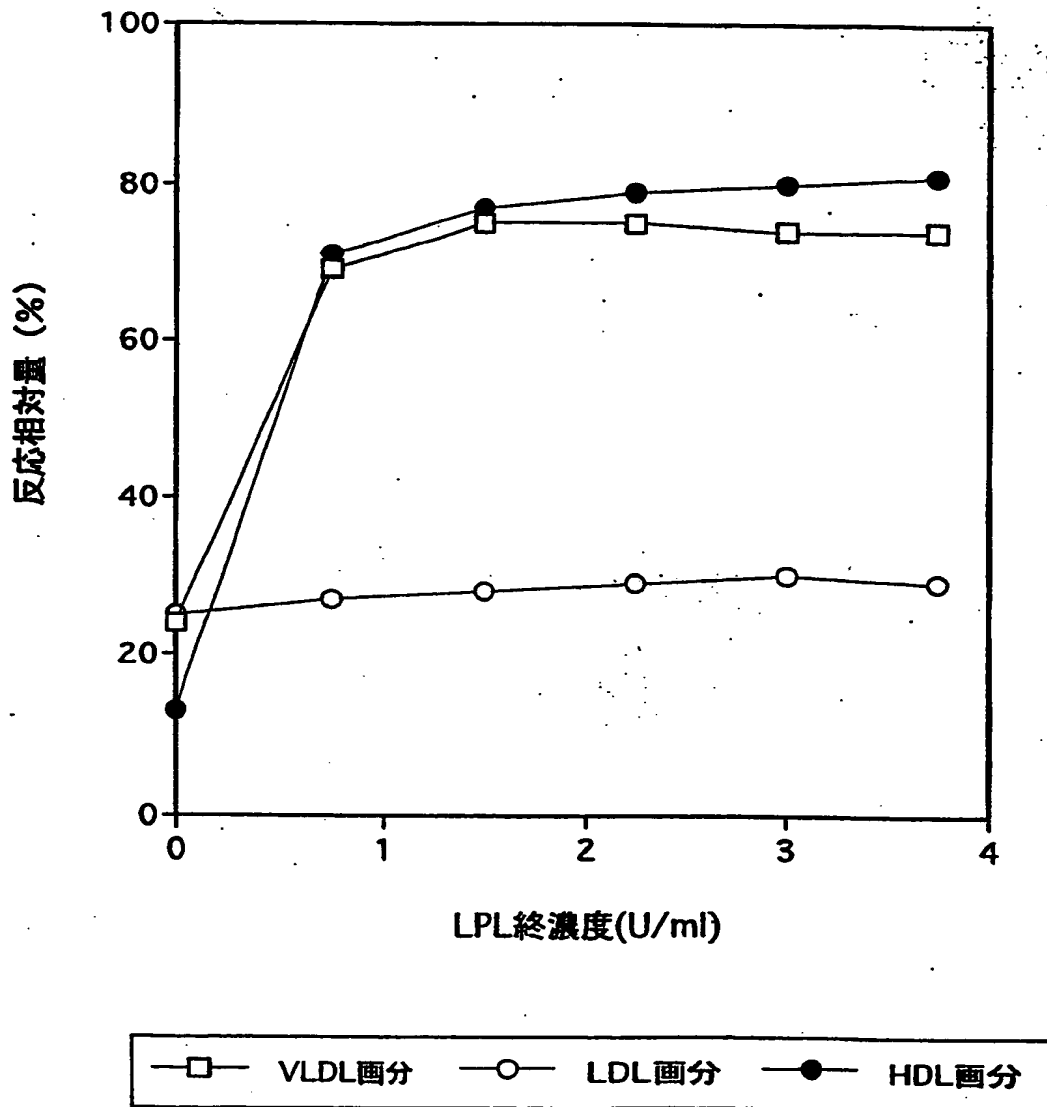
【図 3】 界面活性剤の添加効果を示した図である。（実験 3）

【図 4】 組合せの添加効果を示した図である。（実験 4）

【書類名】 図面

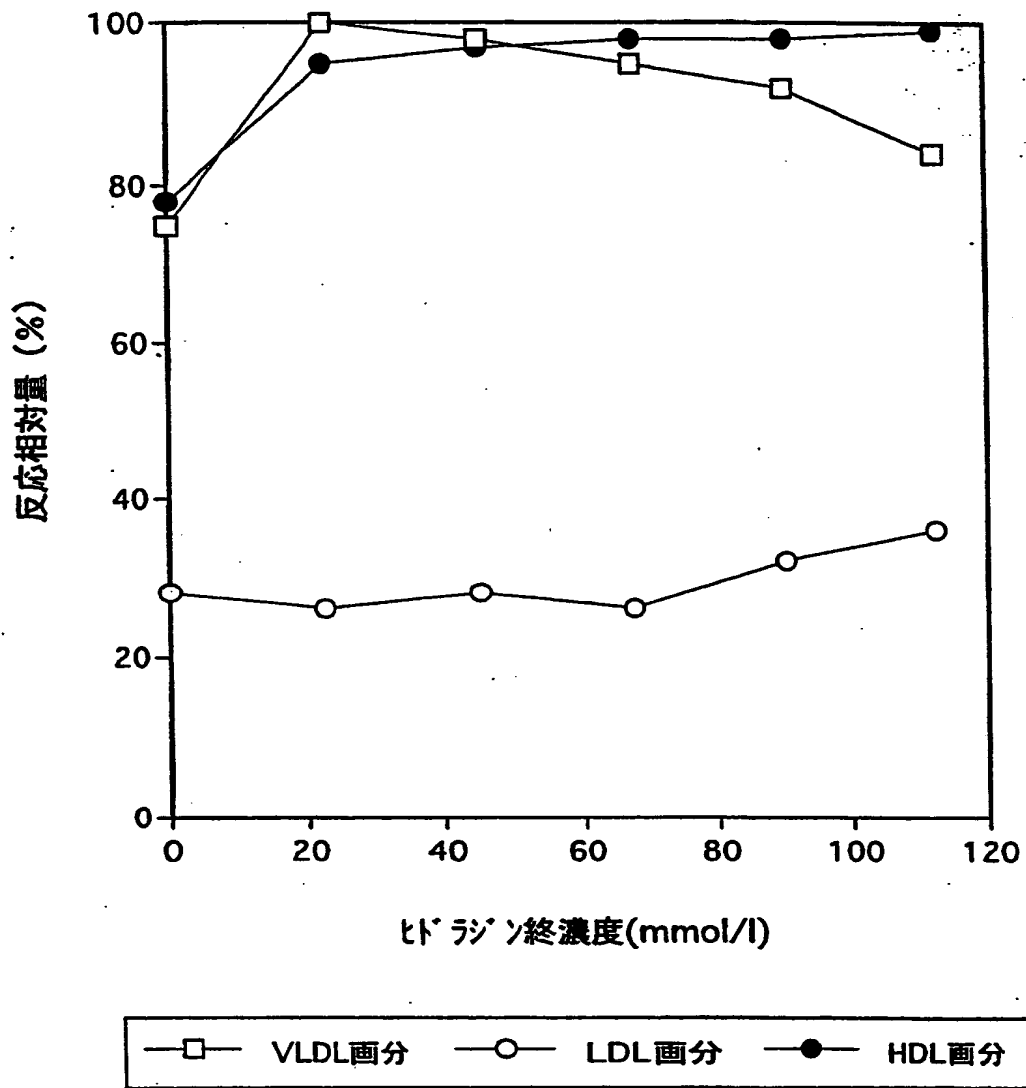
【図 1】

LPL(*Chromobacterium viscosum*)の添加効果



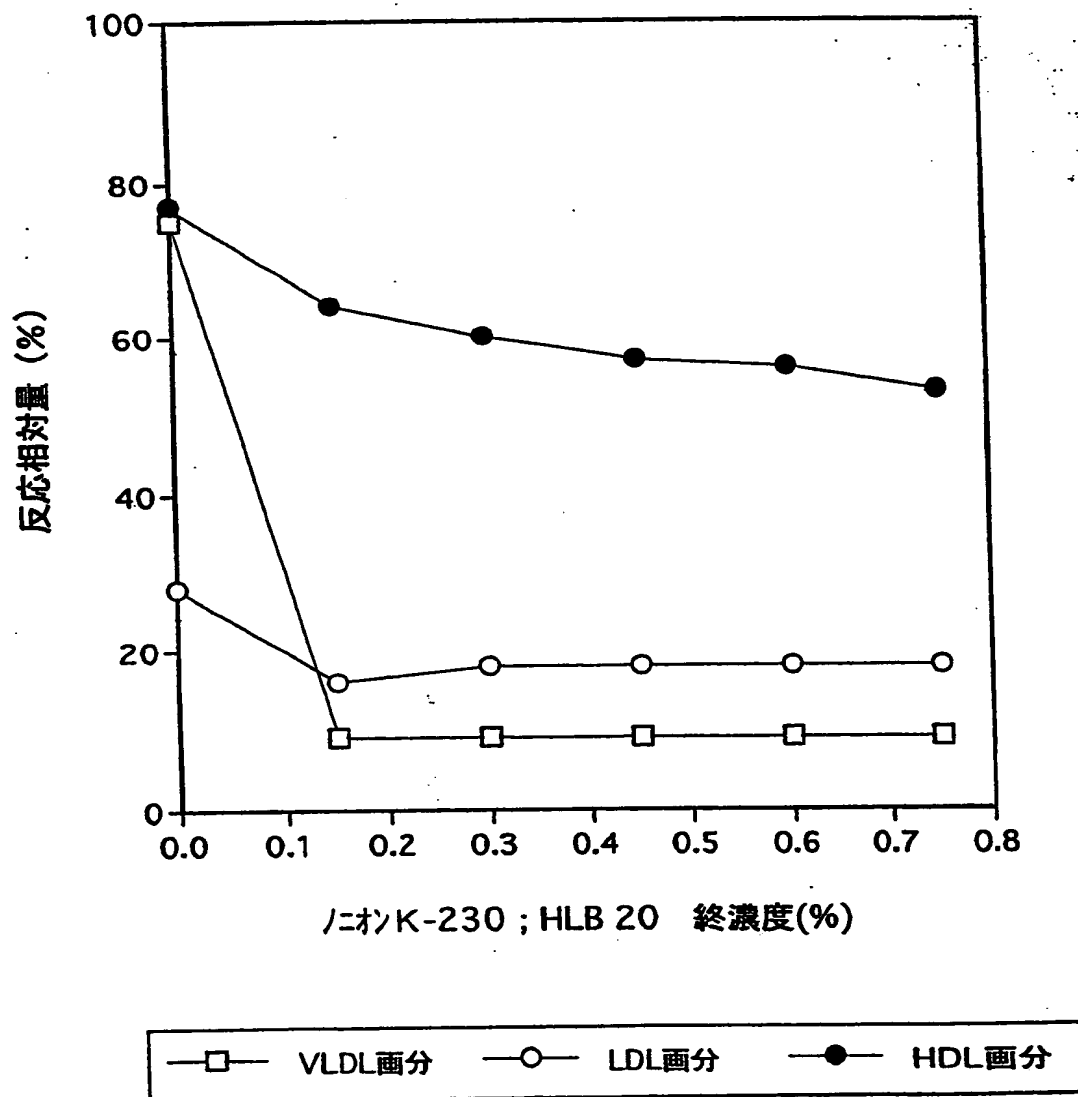
【図 2】

ヒト ラジンの 添加効果



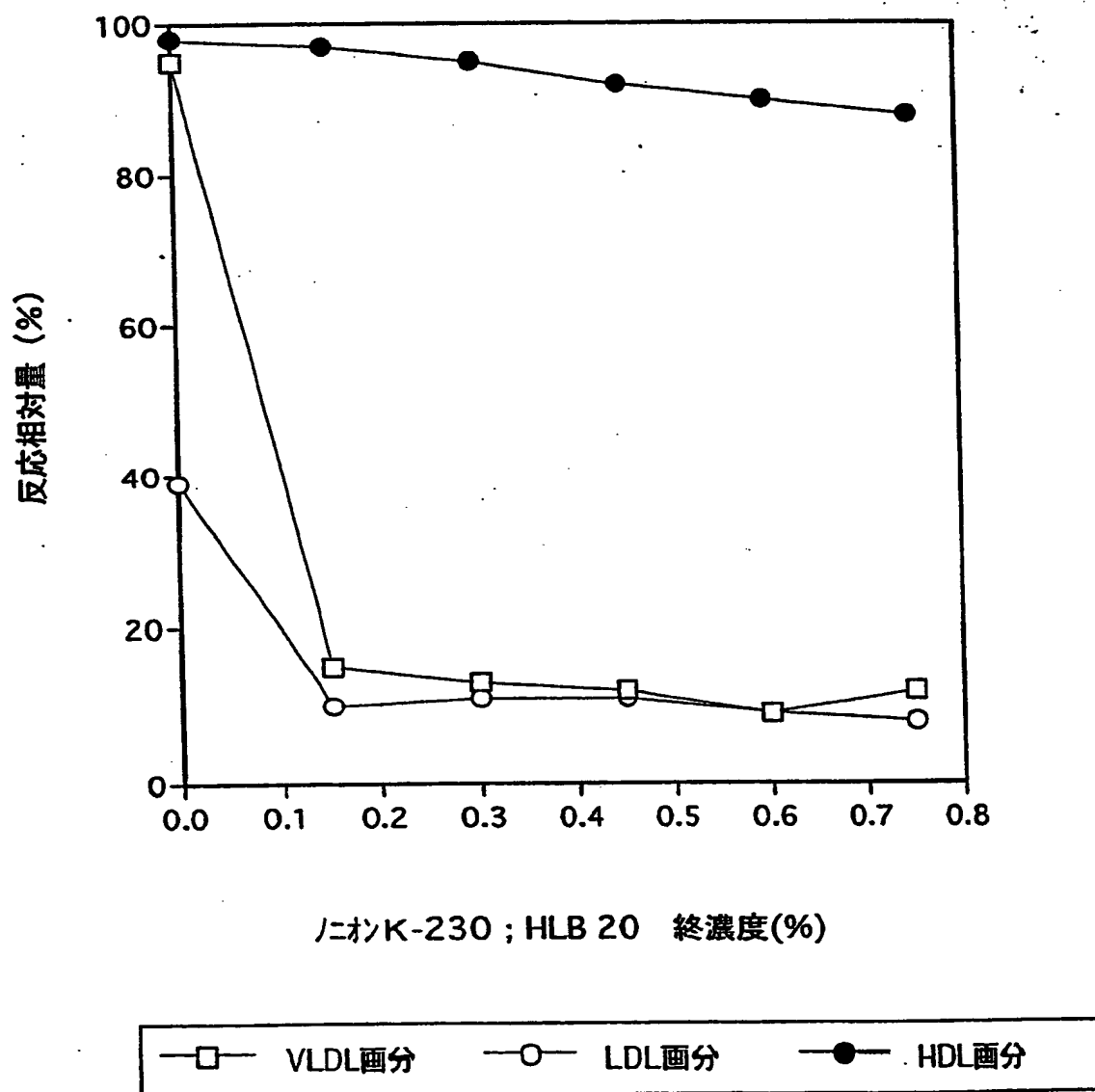
【図 3】

界面活性剤（ノニキ-230）の 添加効果



【図4】

界面活性剤（ノニルK-230）の 添加効果



【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 汎用の自動分析装置を用いて、遠心分離をすることなく、また、反応液中に複合体や凝集体による濁りを形成することなく、生体試料中のHDL（高比重リポ蛋白）、LDL（低比重リポ蛋白）、VLDL（超低比重リポ蛋白）等のリポ蛋白中の特定の成分を定量する方法を提供すること。

【構成】 血清中の特定リポ蛋白画分中の成分を酵素反応で測定する方法において、特異的に該成分を測定するために、特定リポ蛋白画分の測定目的の成分に対してのみ酵素反応を可能にする調整手段を導入する。

【選択図】 なし。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000170565]

1. 変更年月日

1990年 8月21日

[変更理由]

新規登録

住 所

兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

氏 名

国際試薬株式会社

